

# کاهش فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ به دنبال ایجاد تحمل به اثرات ضدردی سدیم سالیسیلات و مرفین

مهدی صادق (M.Sc)، یعقوب فتح‌اللهی\* (Ph.D)، محمد جوان (Ph.D)، سعید سمنانیان (Ph.D)  
دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

## چکیده

سابقه و هدف: آدنوزین سازگان پیک عصبی را در دستگاه اعصاب تنظیم می‌کند. تغییرات سازشی در سیستم آدنوزینی مغز در بعضی شرایط پاتوفیزیولوژیک نظیر قرار گرفتن مزمن در معرض مرفین رخ می‌دهد. در این مطالعه تغییرات سازشی در فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ، به عنوان یک جزء کلیدی در متابولیسم آدنوزین که سبب تبدیل برگشت‌ناپذیر آدنوزین به آمونیوم و اینوزین می‌شود، به دنبال وابستگی به مرفین و تحمل به سدیم سالیسیلات بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: وابستگی به مرفین با روش خوراکی (۲۴ روز، ۰/۴ mg/ml) و تحمل به سدیم سالیسیلات به روش تزریقی (۶ تزریق با فواصل ۲۴ ساعت، ۳۰۰ mg/Kg) ایجاد می‌شد. تحمل در گروه دریافت‌کننده سدیم سالیسیلات با آزمون‌های Tail flick (TF) و Hot Plate (HP) بررسی شد. برای بررسی آنزیمی، هیپوکمپ سمت راست استخراج، در فسفات بافر هموژنیزه و سپس سانتریفیوژ می‌شد. مایع روی محصول سانتریفیوژ برداشته می‌شد. غلظت پروتئین نمونه‌ها با روش برادفورد اندازه‌گیری می‌شد. فعالیت آدنوزین دامیناز با روش کالریمتریک، بر پایه اندازه‌گیری مستقیم آمونیوم تولید شده ناشی از اثر آدنوزین دامیناز بر آدنوزین خارجی بررسی شد.

یافته‌ها: تزریق روزانه سدیم سالیسیلات، سبب افزایش معنادار تأخیر در پاسخ ضدردی در چند روز اول در مقایسه با گروه سالیسیلات (P<0.0001) اما این تأخیر پاسخ در روزهای پنجم و ششم تفاوت معناداری با گروه سالیسیلات نداشت (P>0.05). تزریق مرفین در روز هفتم (۵ mg/Kg)، تأخیر پاسخ بزرگ‌تری را در گروه سالیسیلات نسبت به گروه دچار تحمل به سدیم سالیسیلات نشان داد (P<0.001). فعالیت آدنوزین دامیناز در گروه دریافت‌کننده سوکروز به‌طور معناداری بالاتر از گروه دریافت‌کننده مرفین (P<0.05) و در گروه تجویز سالیسیلات بالاتر از گروه تحمل به سدیم سالیسیلات بود (P<0.05). گروهی که تنها یک بار سدیم سالیسیلات دریافت کردند فعالیت آنزیمی مشابه کنترل‌شان داشتند. تفاوت معناداری بین گروه وابسته به مرفین با گروه تحمل به سدیم سالیسیلات دیده نشد (P>0.05). نتیجه‌گیری: این کاهش فعالیت آدنوزین دامیناز می‌تواند بیانگر وقوع نوعی از تنظیم سازشی در سیستم آدنوزینی هیپوکمپ به دنبال وابستگی به مرفین و تحمل به سدیم سالیسیلات باشد.

واژه‌های کلیدی: آدنوزین دامیناز، هیپوکمپ، تحمل، وابستگی، مرفین، سدیم سالیسیلات

## مقدمه

آزاد می‌شود و بدون این‌که خودش نقش پیک عصبی ایفا کند، با اثر بر سازگان سایر پیک عصب‌ها انتقال سیناپسی را تعدیل می‌کند و در هومئوستاز پیک عصب‌های مغز و تنظیم میزان مصرف انرژی متناسب با منابع موجود نقش ایفا می‌کند [۱، ۲].

آدنوزین یک پورین درون‌زاد مهم در دستگاه اعصاب است که به دنبال روندهای فیزیولوژیک از همه سلول‌های آن

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۴۵ سر موش صحرایی نر جوان (۱۰-۸ هفته) نژاد Wistar استفاده شد. حیوانات در قفس‌های ۴ یا ۵ تایی در حیوان‌خانه گروه فیزیولوژی در شرایط دمای ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس و ۱۲ ساعت نور-۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. حیوانات در تمام دوره قبل و حین آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند و در تمام آزمایش‌ها تلاش شد، تعداد حیوانات در حد نیاز استفاده شود.

ایجاد وابستگی به مرفین: وابستگی به مرفین با روش خوراکی (استفاده از مرفین در آب دریافتی روزانه) ایجاد شد. برای از بین بردن تلخی ناشی از مرفین در آب، از سوکروز ۳٪ استفاده شد. مرفین طبق روش معرفی شده از سوی Bawday و همکاران [۱۴]، به صورت ۰/۸ mg/ml، ۰/۲ mg/ml، ۰/۳ mg/ml، هر کدام برای ۴۸ ساعت و سپس ۰/۴ mg/ml تا ۲۴ روز مورد استفاده قرار گرفت. گروه کنترل تنها سوکروز ۳٪ دریافت می‌کردند. هیپوکمپ این حیوانات در روز ۲۵ استخراج و برای اندازه‌گیری فعالیت آدنوزین دامیناز در ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری می‌شد.

ایجاد تحمل به سدیم سالیسیلات و تحمل متقاطع آن با مرفین: تحمل به سدیم سالیسیلات به روش تزریقی (۶ تزریق روزانه به صورت ۳۰۰ mg/Kg, i.p.) ایجاد می‌شد. در گروه کنترل نرمال سالیسیلات تزریق می‌شد. برای بررسی تحمل متقاطع، در روز هفتم به گروه‌های دریافت‌کننده نرمال سالیسیلات و سدیم سالیسیلات، مرفین سولفات (۵ mg/Kg, i.p.) تزریق می‌شد. وقوع تحمل ۱۵ دقیقه بعد از هر تزریق با آزمون‌های Tail flick (TF) و Hot plate (HP) بررسی می‌شد.

برای بررسی فعالیت آنزیمی، در دو گروه مجزا (n=۵) بعد از ۶ تزریق نرمال سالیسیلات یا سدیم سالیسیلات (طبق روش بالا) در روز هفتم هیپوکمپ استخراج و برای اندازه‌گیری فعالیت آدنوزین دامیناز در ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری می‌شد. بررسی ایجاد تحمل به اثر ضددردی سدیم سالیسیلات: دو گروه آزمایشی برای آزمون HP (گروه نرمال سالیسیلات n=۴ و گروه سدیم سالیسیلات n=۴) و دو گروه برای آزمون TF

گزارش‌های مختلفی در خصوص نقش موثر سیستم آدنوزینی در شکل‌پذیری سیناپسی در نواحی قشری جدید و قدیم مغز وجود دارد [۴،۳]. هم‌چنین این سیستم در شرایط پاتوبیولوژیک نظیر تحمل و وابستگی دست‌خوش تغییرات سازشی می‌شود و هومئوستاز سیستم‌های پیک عصبی را بهم می‌زند و شکل‌پذیری سیناپسی را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۶،۵]. آدنوزین دامیناز در سیستم عصبی مرکزی به‌عنوان یک آنزیم کلیدی نقش مهمی در حذف آدنوزین داخل و خارج سلول از طریق دامینه کردن آدنوزین و تبدیل غیرقابل برگشت آن به اینوزین بازی می‌کند [۷]. در بسیاری از سلول‌ها این آنزیم به صورت Colocalize با گیرنده آدنوزینی A1 قرار گرفته است [۸] که نقش مهمی در تعدیل اثر آدنوزین و هم‌چنین غیرحساس شدن گیرنده دارد [۱۰،۹]. تغییر در سطح فعالیت این آنزیم در شرایط فیزیولوژیک یا پاتوفیزیولوژیک دستگاه اعصاب که با تغییرات سطح آدنوزین همراه هستند، متصور است.

به دلیل اثرات جانبی داروهای ضد درد اپیوئیدی از جمله ایجاد تحمل، وابستگی فیزیکی و عوارض گوارشی که استفاده از آن‌ها را محدود می‌کند، تمایل به استفاده از ترکیبی از اپیوئیدها و NSAIDs که اثرات ضددردی قوی‌تر همراه با عوارض گوارشی کم‌تری دارند رو به افزایش است [۱۱]. نشان داده شده است که استفاده مزمن از مشتقات سالیسیلیک اسید سبب بروز تحمل به اثرات ضد دردی آن‌ها شده هم‌چنین اثرات ضددردی مرفین نیز کاهش می‌یابد و به عبارتی مصرف مزمن مشتقات سالیسیلیک اسید سبب بروز تحمل متقاطع نسبت به اثرات ضددردی مرفین می‌شود [۱۲].

ما در ادامه بررسی‌های قبلی [۱۳] پیرامون نقش سیستم آدنوزینی هیپوکمپ و تغییرات سازشی آن در بعضی مدل‌ها از شرایط پاتوفیزیولوژیک دستگاه اعصاب نظیر وابستگی به مرفین و پیامدهای آن بر فعالیت‌های سیناپسی این ساختار، در این مطالعه تغییرات فعالیت آنزیم آدنوزین دامیناز هیپوکمپ را در مدل وابستگی به مرفین و تحمل به سدیم سالیسیلات بررسی کردیم.

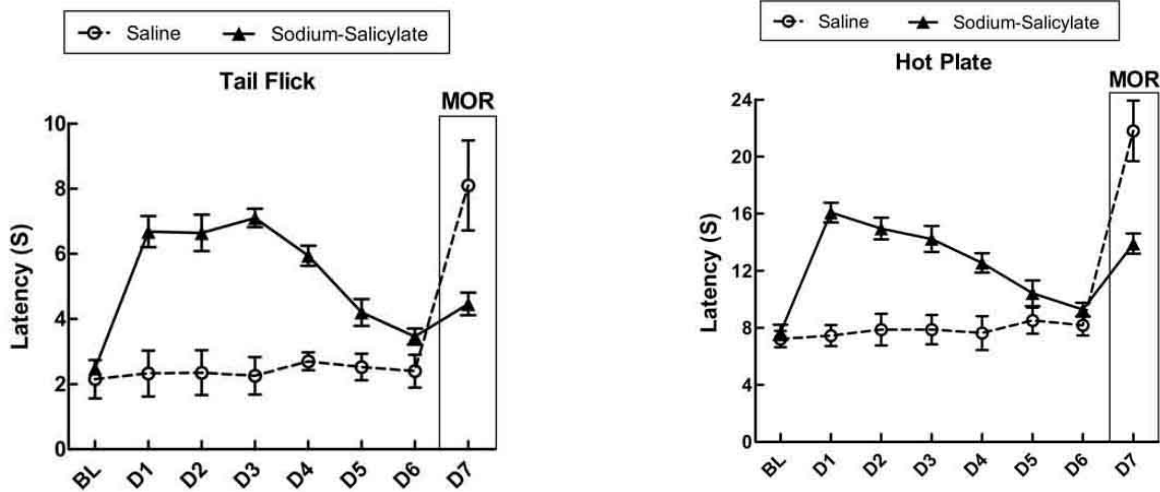
آنزیمی با آلکالین هیپوکلریت و فنول موجود در محیط و در حضور کاتالیزور نیتروپرو ساید واکنش داده و اندوفنول (آبی رنگ) تولید می‌کند بنابراین میزان تولید آمونیوم به‌طور مستقیم متناسب با جذب نوری اندوفنول در ۶۲۰ است. از محلول آمونیوم سولفات ۷۵ میکرومولار به‌عنوان استاندارد استفاده می‌شد. مقادیر فعالیت آنزیمی در نمونه‌های استخراج شده از هیپوکمپ سمت راست بر اساس (U/mg of protein) نشان داده شده است. مقادیر خوانده شده از میزان جذب نوری در دستگاه اسپکتروفوتومتر، سه بار تکرار و میانگین آن‌ها برای محاسبه استفاده می‌شد.

## نتایج

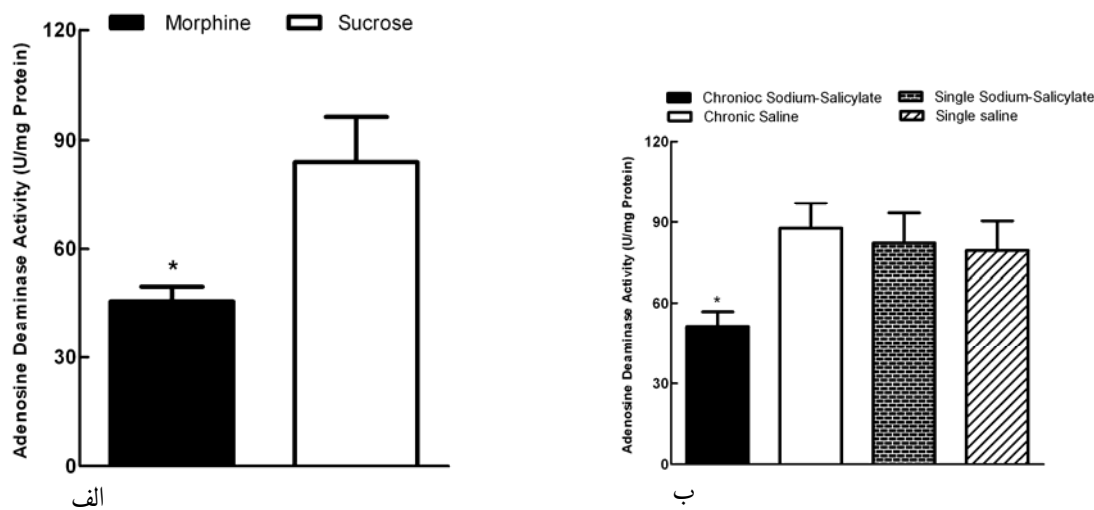
تحمل به سدیم سالیسیلات در آزمون‌های TF و HP: در شکل ۱ تحمل به اثر ضددردی سدیم سالیسیلات هم‌چنین تحمل متقاطع آن با مرفین (روز هفتم)، در آزمون‌های درد حاد دیده می‌شود. تحلیل آماری با آزمون Two-way RM ANOVA و پس‌آزمون Bonferroni نشان می‌دهد که به‌دنبال تزریق اول تا چهارم سدیم سالیسیلات، افزایش معناداری در میزان تأخیر پاسخ نسبت به BL و هم‌چنین نسبت به گروه سالیین، در هر دو آزمون TF و HP به‌وجود می‌آید (TF:  $F_{7,56} = 21.81$  and HP:  $F_{7,48} = 46.29$ ,  $P < 0.0001$ ) اما این اثر ضددردی بعد از تزریق روز پنجم شروع به کاهش می‌کند (در آزمون TF,  $P < 0.05$  و در آزمون HP,  $P > 0.05$ ) و در روز ششم میزان تأخیر در پاسخ تفاوت معناداری با پاسخ BL و هم‌چنین گروه سالیین ندارد. تزریق مرفین سولفات (۵ mg/Kg, i.p.) در روز هفتم در هر دو گروه سالیین و سدیم سالیسیلات بروز تحمل متقاطع را نشان می‌دهد به‌طوری‌که در هر دو آزمون دردسنجی، میزان تأخیر پاسخ در گروهی که نرمال سالیین دریافت کرده‌اند به‌طور معناداری بزرگ‌تر از تأخیر پاسخ در گروه دچار تحمل به سدیم سالیسیلات است ( $P < 0.0001$ ). در تمام گروه‌ها این آزمایش (n=۴) بود بجز گروه دریافت‌کننده سدیم سالیسیلات در آزمون TF که (n=۵) بود.

(گروه نرمال سالیین n=۴ و گروه سدیم سالیسیلات n=۵) در نظر گرفته شدند. دو روز قبل از آزمایش‌ها، هر یک از حیوانات هر روز به مدت ۵ دقیقه در دستگاه HP یا TF قرار می‌گرفتند تا با شرایط و محیط آشنا شده و استرس آزمایش تا حد ممکن از بین برده شود. یک روز قبل از شروع تزریق، آزمون اندازه‌گیری پاسخ پایه (BL) از حیوانات گرفته می‌شد. در روزهای بعدی ۱۵ دقیقه بعد از تزریق حیوانات در دستگاه قرار می‌گرفت و میزان پاسخ اندازه‌گیری می‌شد. دمای HP روی ۵۰ درجه سلسیوس و شدت نور TF روی ۵۰ تنظیم می‌شد. زمان Cut-off در آزمون HP و در آزمون TF به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۱۰ ثانیه در نظر گرفتیم. آزمون TF برای هر حیوان سه بار تکرار و از میانگین سه عدد برای تحلیل آماری استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی: فعالیت آدنوزین دامیناز با استفاده از روش معرفی شده توسط Giusti [۱۵] اندازه‌گیری شد. در این روش از آمونیوم تولید شده ناشی از اثر آدنوزین دامیناز (موجود در نمونه‌ها) بر آدنوزین (اضافه شده به واکنش) برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی استفاده می‌شود. در ابتدا غلظت پروتئین نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ELISA reader و به روش برادفورد [۱۶] اندازه‌گیری شد (از سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد استفاده شد). سپس حجم معادل ۰/۵ میلی‌گرم پروتئین از هر نمونه وارد واکنش آنزیمی شد. واکنش آنزیمی با افزودن ۵۰ میکرولیتر آدنوزین ۴۲ میکرومولار (غلظت نهایی ۲۱ میکرومولار خواهد بود) به محیط واکنش متشکل از حجم ۵۰ میکرولیتر نمونه و بافر فسفات که ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شده بود، آغاز می‌شد. بعد از یک ساعت انکوبه کردن واکنش در ۳۷ درجه واکنش با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر فنول-نیتروپرو ساید متوقف می‌شد و بلافاصله ۱۵۰ میکرولیتر آلکالین هیپوکلریت به واکنش اضافه شده و ورتکس می‌شود. در ادامه واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شده و در پایان با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و در طول موج ۶۲۰ نمونه‌ها خوانده می‌شد. آمونیوم تولید شده طی واکنش



شکل ۱. ایجاد تحمل به اثر ضد درد سدیم سالیسیلات در مصرف مزمن و تحمل متقاطع با مرفین. آزمون آماری Two-way ANOVA و پس آزمون Tukey ایجاد تحمل به اثر ضد درد سدیم سالیسیلات به دنبال تزریق داخل صفاقی آن (i.p.) در ۶ روز متوالی با استفاده از Tail Flick و Hot Plate نشان می‌دهد، بعلاوه تحمل به اثر ضد درد مرفین (MOR) در گروه دریافت کننده سدیم سالیسیلات با تزریق مرفین سولفات (۵ mg/Kg, i.p.) در روز ۷ مشاهده می‌شود. BL (Baseline) بیانگر تأخیر پاسخ در روز قبل از شروع تزریقات می‌باشد. میزان تأخیر در پاسخ (کشیدن دم یا پای سمت راست و عقب) ۱۵ دقیقه بعد از تزریق به دست آمده و نتایج به صورت  $Mean \pm S.E.M$  نشان داده شده است. در آزمون Tail Flick پاسخ هر حیوان از میانگین سه بار تکرار آزمون محاسبه شده است. در آزمون Tail Flick،  $n=5$  و در آزمون Hot Plate،  $n=4$  است.



شکل ۲. کاهش فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ بدنبال وابستگی به مرفین و تحمل به سدیم سالیسیلات. در بخش الف تحلیل آماری Two-tailed unpaired t-test کاهش معناداری ( $P < 0.05$ ) در فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ بدنبال وابستگی به مرفین نشان می‌دهد. در قسمت ب آزمون One-way ANOVA پس آزمون Tukey نشان دهنده کاهش فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ بدنبال با سدیم سالیسیلات است ( $P < 0.05$ ), در حالیکه در گروهی که یک بار تزریق سدیم سالیسیلات انجام شده و دچار تحمل نبوده اند فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ بدنبال با سدیم سالیسیلات تفاوت معناداری با گروه سالین ندارد. در قسمت ج هر چند کاهش بیشتری در فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ بدنبال نسبت به مرفین نسبت به گروه تحمل به سدیم سالیسیلات دیده می‌شود اما آزمون Two-tailed unpaired t-test تفاوت معناداری را نشان نداد. تعداد حیوانات در گروه‌های تحمل به سدیم سالیسیلات و سالین مزمن ۵ و در بقیه گروه‌های این آزمایش ۴ بود. داده‌ها به صورت  $Mean \pm S.E.M$  و فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ بدنبال براساس Unite در هر میلی گرم پروتئین ارئه شده است.

مرفین و تحمل به سدیم سالیسیلات کاهش پیدا کرده است. در قسمت الف شکل ۲ تحلیل آماری Two-tailed unpaired t-test نشان می‌دهد که فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ بدنبال وابستگی به مرفین در

تغییر فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ بدنبال وابستگی به مرفین و تحمل به سدیم سالیسیلات: شکل ۲ نشان می‌دهد فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ در گروه‌های دچار وابستگی به

اعصاب سبب بروز اثرات ضددردی می‌شود [۱۹، ۱۸]. اثرات ضددردی مرفین از طریق فعال کردن مسیر ضددرد پائین‌رو از ساقه مغز به شاخ خلفی نخاع صورت می‌گیرد. به علاوه تزریق مزمن NSAIDs به صورت سیستمیک یا داخل PAG سبب فعال شدن مسیر نزولی ضددرد شده که بخشی از این مسیر شامل نورون‌های اپیوئیدریژیک است [۲۰]. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که تزریق مکرر بعضی از NSAIDs نظیر Aspisol و Asalis (مشتقات تجاری سالیسیک اسید) سبب کاهش اثر ضددردی آن‌ها و بروز تحمل می‌شود هم‌چنین نسبت به اثر ضددردی مرفین نیز تحمل ایجاد می‌شود. تزریق نالوکسان به دنبال تحمل به سدیم سالیسیلات سبب بروز علائم سندرم ترک می‌شود که بیانگر فعال شدن سیستم اپیوئیدی مغز به دنبال تزریق مکرر NSAIDs است [۲۱، ۱۲]. نتایج ما نیز بروز تحمل را به دنبال تجویز مزمن سدیم سالیسیلات (مشتق دیگری از سالیسیک اسید) و تحمل متقاطع آن با مرفین را نشان داد. در گزارشی که Pernia و همکارانش ارائه کردند [۱۲] دو داروی Asalis و Aspisol در فاصله‌های زمانی ۱۲ ساعت تزریق شدند و در تزریق چهارم و پنجم تحمل بروز کرده بود. ما در این مطالعه سدیم سالیسیلات را با فواصل ۲۴ ساعت تجویز کردیم و تحمل در تزریقات پنجم و ششم مشاهده شد. به دلیل آمار بالایی مرگ حیوانات به دنبال دو تزریق روزانه سدیم سالیسیلات که در آزمایش‌های مقدماتی مشاهده کردیم (۳ مورد مرگ از ۶ حیوان) به همین دلیل تزریقات را با فاصله ۲۴ ساعت انجام دادیم که هم آمار تلفات را کاهش یافت (۲ مورد مرگ از ۱۵ حیوان) و هم تحمل ایجاد شد.

مشخص شده است که مصرف مزمن مرفین و پیامدهای تحمل و وابستگی ناشی از آن، سبب القاء تغییرات سازشی در سطوح سلولی و ملکولی در یاخته‌های نواحی مغزی از جمله هیپوکمپ می‌شود [۲۳، ۲۲]. تغییرات سطح آدنوزین خارج سلولی در دستگاه عصبی به دنبال مصرف مزمن مرفین اتفاق می‌افتد و مشخص شده تغییر فعالیت آدنوزین دامیناز در این میان مهم است [۲۴]. هم‌چنین به دنبال مصرف مزمن مرفین

مقایسه با گروه سوکروز کاهش معناداری پیدا کرده است ( $n=4$  و  $t_6=2.86$ ,  $P<0.05$ ). در قسمت ب شکل ۲ آزمون one-way ANOVA و پس‌آزمون Tukey نشان‌دهنده کاهش معنادار فعالیت آنزیمی به دنبال تحمل به سدیم سالیسیلات نسبت به گروه سالیسیک اسید است ( $F_{3,17}=41/3$ ,  $P<0.05$ ) و ( $n=5$ ) در حالی که در گروهی که تنها یک بار سدیم سالیسیلات دریافت می‌کردند ( $n=4$ ) (دچار تحمل نبودند) فعالیت آنزیمی تفاوت معناداری با گروه سالیسیک (یک بار تزریق) ندارد.

بنابراین کاهش فعالیت آنزیمی ناشی از تجویز مزمن سدیم سالیسیلات و وقوع تحمل به است و یک‌بار تجویز آن اثری در فعالیت آنزیمی ندارد. مقایسه فعالیت آنزیمی در گروه وابسته مرفین ( $45/5 \pm 4/097$ ) و تحمل به سدیم سالیسیلات ( $51/32 \pm 5/427$ ) با استفاده از Two-tailed unpaired t- test تفاوت معناداری را نشان نمی‌دهد ( $t_7=0/8165$ )، هر چند در گروه وابسته به مرفین کاهش بیش‌تری در فعالیت آنزیم اتفاق افتاده است.

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش ما نشان داد که به دنبال وابستگی به مرفین و هم‌چنین تحمل به سدیم سالیسیلات سطح فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ کم می‌شود. این کاهش می‌تواند بیانگر نوعی تنظیم سازشی سیستم آدنوزینی هیپوکمپ در پاسخ به تغییر سطح آدنوزین در شرایط وابستگی به مرفین یا تحمل به سدیم سالیسیلات که مدل‌هایی از شرایط پاتوفیزیولوژیک مغز هستند، باشد.

سالیسیک اسید و مشتقات آن از جمله آسپرین یکی از پرمصرف‌ترین داروهای ضدالتهاب و ضددرد غیراستروئیدی (NSAIDs) است. مکانیسم اصلی اثر ضدالتهابی آسپرین مهار آنزیم COX-2 و جلوگیری از سنتز پروستاگلاندین‌ها می‌باشد [۱۷]. بخشی از اثرات ضددردی NSAIDs مربوط به اثر ضدالتهابی آن‌ها و بخشی نیز مربوط به اثر آن‌ها بر CNS و فعال کردن مسیر نزولی ضددرد است. شواهد نشان می‌دهد که این دارو با فعال کردن مجموعه اپیوئیدی درون‌زاد دستگاه

سیستم ایپوئیدی بر سیستم آدنوزینی مغز و هیپوکمپ و ایجاد تغییرات سازشی در آن، به نظر می‌رسد حضور مزمن سدیم سالیلات بر سیستم آدنوزینی در نواحی مغزی نظیر هیپوکمپ اثر گذاشته و تغییرات سازشی در آن را سبب می‌شود که نمونه آن تغییر میزان فعالیت آدنوزین دامیناز است.

آدنوزین در شکل‌پذیری سیناپسی و اعمال شناختی مغز و هیپوکمپ نقش دارد [۲۶،۳،۲]. بنابراین تغییرات سازشی در سیستم آدنوزینی هیپوکمپ به دنبال حضور مزمن سدیم سالیلات می‌تواند منشأ اثر بر سایر اعمال هیپوکمپ از جمله اعمال شناختی آن باشد، که البته این فرضیه نیازمند مطالعات عمیق‌تری می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر از محل هزینه‌های پژوهشی دانشکده پزشکی (مربوط به رساله‌های دکتری) دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

## منابع

- [1] Ribeiro JA, Sebastiao AM. Modulation and metamodulation of synapses by adenosine. *Acta Physiol (Oxf)* 2010; 199: 161-169.
- [2] Sebastião AM, Ribeiro JA. Tuning and fine-tuning of synapses with adenosine. *Curr Neuropharmacol* 2009; 7: 180-194.
- [3] Moore KA, Nicoll RA, Schmitz D. Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 14397-1402.
- [4] Fujii S, Kuroda Y, Ito K, Kaneko K, Kato H. Effects of adenosine receptors on the synaptic and EPSP-spike components of long-term potentiation and depotentiation in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 1999; 521: 451-466.
- [5] Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 193: 471-534.
- [6] Listos J, Talarek S, Fidecka S. Involvement of adenosine receptor agonists on the development of hypersensitivity to acute dose of morphine during morphine withdrawal period. *Pharmacol Rep* 2008; 60: 679-685.
- [7] Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 2001; 79: 463-484.
- [8] Beraudi A, Traversa U, Villani L, Sekino Y, Nagy JI, Poli A. Distribution and expression of A1 adenosine receptors, adenosine deaminase and adenosine deaminase-binding protein (CD26) in goldfish brain. *Neurochem Int* 2003; 42: 455-464.
- [9] Hashikawa T, Hooker SW, Maj JG, Knott-Craig CJ, Takedachi M, Murakami S, Thompson LF. Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. *FASEB J* 2004; 18: 131-133.
- [10] Ginés S, Ciruela F, Burgueño J, Casadó V, Canela EI, Mallol J, et al. Involvement of caveolin in ligand-induced recruitment and internalization of A(1) adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 1314-1323.

تغییرات سیستم آدنوزینی از جمله تغییر سطح آدنوزین خارج سلولی در هیپوکمپ گزارش شده است [۲۵،۱۳]. نتایج ما در بخش آنزیمی نشان داد که فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ به دنبال وابستگی به مرفین کاهش می‌یابد که می‌تواند شاهدی از تغییرات سازشی سیستم آدنوزینی هیپوکمپ به دنبال شرایط تحمل و وابستگی باشد، به طوری که فعالیت آدنوزین دامیناز متأثر از شرایط جدید تغییر کرده تا سطح آدنوزین خارج سلولی متناسب با نیاز و شرایط تنظیم شود. گزارش Lu و همکارانش [۲۵] نشان می‌دهد که مصرف مزمن مرفین سبب کاهش توان القای LTP در ناحیه CA1 می‌شود و دلیل آن تجمع آدنوزین و تاثیر آن از طریق گیرنده A1 است به طوری که استفاده از مهارگر A1 و یا آنزیم آدنوزین دامیناز سبب برگشت توان القای LTP شد. این نتایج بیانگر این است که در این شرایط تغییرات سازشی این آنزیم متناسب با افزایش میزان آدنوزین نبوده تا آدنوزین اضافه را از محیط حذف کند و یا مصرف مزمن مرفین سبب تغییرات کاهشی در فعالیت آنزیم شده است. نتایج ما به احتمال دوم نزدیک‌تر است. هم‌چنین نتایج Nelson و همکارانش [۲۴] نشان داده بودند که کاهش سطح آدنوزین مغز به دنبال مصرف مزمن ایپوئیدها ناشی از کاهش فعالیت آدنوزین دامیناز است. این نتیجه برخلاف یافته ما در مورد هیپوکمپ است. به هر حال در این گزارش فعالیت آنزیم آدنوزین دامیناز در مایع مغزی نخاعی اندازه‌گیری شده که تنها می‌تواند شاخصی از فعالیت این آنزیم در کل مغز و نخاع باشد. از آنجا که تغییرات سطح آدنوزین و هم‌چنین توزیع گیرنده‌های آدنوزینی در نواحی مختلف مغز یکسان نیست بنابراین دلیلی وجود ندارد که کاهش فعالیت این آنزیم در CSF بیانگر کاهش فعالیت آن در ساختارهایی نظیر هیپوکمپ باشد.

نتایج ما هم‌چنین کاهش فعالیت آدنوزین دامیناز هیپوکمپ به دنبال تحمل به سدیم سالیلات را نشان داد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و آنچه از مطالعات دیگران به دست می‌آید، به دلیل وساطت سیستم ایپوئیدی درون‌زاد در اثرات ضددری سدیم سالیلات و با توجه به تاثیرات ثابت شده

administered celecoxib are mediated by endogenous opioids. *Pain* 2009; 142: 94-100.

[20] Christie MJ, Connor M, Vaughan CW, Ingram SL, Bagley EE. Cellular actions of opioids and other analgesics: implications for synergism in pain relief. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 520-523.

[21] Tortorici V, Aponte Y, Acevedo H, Nogueira L, Vanegas H. Tolerance to non-opioid analgesics in PAG involves unresponsiveness of medullary pain-modulating neurons in male rats. *Eur J Neurosci* 2009; 29: 1188-1196.

[22] Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 1997; 278: 58-63.

[23] Gintzler AR, Chakrabarti S. Post-opioid receptor adaptations to chronic morphine; altered functionality and associations of signaling molecules. *Life Sci* 2006; 79: 717-722.

[24] Nelson AM, Battersby AS, Baghdoyan HA, Lydic R. Opioid-induced decreases in rat brain adenosine levels are reversed by inhibiting adenosine deaminase. *Anesthesiology* 2009; 111: 1327-1333.

[25] Lu G, Zhou QX, Kang S, Li QL, Zhao LC, Chen JD, et al. Chronic morphine treatment impaired hippocampal long-term potentiation and spatial memory via accumulation of extracellular adenosine acting on adenosine A1 receptors. *J Neurosci* 2010; 30: 5058-5070.

[26] Pietersen AN, Lancaster DM, Patel N, Hamilton JB, Vreugdenhil M. Modulation of gamma oscillations by endogenous adenosine through A1 and A2A receptors in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology* 2009; 56: 481-492.

[11] Déciga-Campos M, López UG, Reval MI, López-Muñoz FJ. Enhancement of antinociception by co-administration of an opioid drug (morphine) and a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor (rofecoxib) in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 460: 99-107.

[12] Pernia-Andrade AJ, Tortorici V, Vanegas H. Induction of opioid tolerance by lysine-acetylsalicylate in rats. *Pain* 2004; 111: 191-200.

[13] Hosseinmardi N, Fathollahi Y, Naghdi N, Javan M. Theta pulse stimulation: a natural stimulus pattern can trigger long-term depression but fails to reverse long-term potentiation in morphine withdrawn hippocampus area CA1. *Brain Res* 2009; 1296: 1-14.

[14] Badawy AA, Evancs CM, Evans M. Production of tolerance and physical dependence in the rat by simple administration of morphine in drinking water. *Br J Pharmacol* 1982; 75: 485-491.

[15] Giusti G. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HV (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York NY 1974; 1092-1099.

[16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

[17] Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res* 2003; 110: 255-158.

[18] Vanegas H, Tortorici V. Opioidergic effects of nonopioid analgesics on the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 2002; 22: 655-661.

[19] Rezende RM, Dos Reis WG, Duarte ID, Lima PP, Bakhle YS, de Francischi JN. The analgesic actions of centrally

# Tolerance to anti-nociceptive effects of sodium-salicylate and morphine decreases adenosine deaminase activity in the rat hippocampus

Mehdi Sadegh (M.Sc), Yaghoub Fathollahi (Ph.D)<sup>\*</sup>, Mohammad Javan (Ph.D), Saeed Semnani (Ph.D)  
Dept. of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: 24 Apr 2011 Accepted: 20 Sep 2011)

**Introduction:** Adenosine has been considered as a fine-tuner of the neurotransmitters in the nerve system. Adaptive changes in the brain adenosine system occur in some patho-physiological situations such as chronic exposure to morphine. In this study, the adaptive changes in the adenosine deaminase activity as a key enzyme in the adenosine metabolism that converts adenosine to inosine and ammonia, irreversibly, due to morphine dependence and tolerance to anti-nociceptive effects of sodium-salicylate were investigated.

**Materials and Methods:** Morphine dependence was induced by morphine administration in tap water (0.4mg/ml for 24 days). Tolerance to sodium-salicylate was induced by 6 i.p. injection (1 injection/day) of sodium-salicylate. Tolerance to antinociceptive effects of sodium-salicylate was measured by tail flick (TF) and hot plate (HP) tests. Right hippocampus was dissected, homogenized at phosphate buffer, centrifuged and then the supernatant fraction was isolated. Protein content of the samples was measured by the Bradford method. Hippocampus adenosine deaminase activity was measured by a calorimetric method of enzyme assay which is based on the direct measurement of the produced ammonia from excessive adenosine degradation by adenosine deaminase.

**Results:** Daily injection of Sodium-salicylate produced antinociception in early days by latency increase rather than saline injection ( $P < 0.0001$ ) but in the following days this antinociceptive effect progressively decreased so at the day 5 and 6 following injection it was similar to saline ( $P > 0.05$ ). Injection of morphine (5mg/Kg) at the day 7 showed more increase in the latency of saline injected rather than sodium-salicylate injected ( $P < 0.001$ ). Adenosine deaminase activity was significantly higher in sucrose administrated rather than chronic morphine administrated ( $P < 0.05$ ) and in saline injected rather than sodium-salicylate injected ( $P < 0.05$ ). Single injection of sodium-salicylate and its control shows the same activity. There was no significant difference in enzyme activity of morphine dependent with sodium-salicylate tolerance ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** This decline in the adenosine deaminase activity may be related with adaptation in brain adenosine system subsequent of dependent to morphine or tolerance to sodium-salicylate.

**Keywords:** Adenosine deaminase, Hippocampus, Tolerance, Dependency, Morphine, Sodium-Salicylate

\* Corresponding author: Fax: +98 21 82883101; Tel: +98 21 82882009  
fatollahi@modares.ac.ir